

Abstract

Neuronal Ceroid Lipofuscinoses (NCL) are a group of inherited lysosomal storage disorders. The most common subtype of these rare but severe diseases is the juvenile form (jNCL). The inaugural symptom is vision loss followed by mental decline, seizures and loss of motoric abilities leading to premature death in the late twenties. The underlying genetic defects are mutations in the *Cln3* gene encoding a ubiquitously expressed lysosomal transmembrane protein of an unclear function. Particular frequently patients show a deletion of exon 7 and 8 (< 80 %) resulting in a premature stop codon and therefore to accumulation of storage material in lysosomes and neuronal cell death.

Retinal neuronal degeneration is usually accompanied by microglial reactivity. As cells of the innate immune system, microglial cells serve the function of maintenance of tissue homeostasis in the brain and retina. In physiological conditions microglial cells exhibit a characteristic morphology with long and branched protrusions with which they scan their microenvironment. Severe neuronal cell death can lead to chronic microglial reactivity. Characterized by a morphological shift towards an amoeboid shape with retracted protrusions, migration from the plexiform layers towards the site of lesion, a high release of cytotoxins and phagocytosis of living photoreceptor cells, microglial reactivity leads to additional damage of neuronal tissue.

To evaluate the influence of microglial reactivity in detail during jNCL pathology, the *Cln3*^{Δex7/8} mouse model, carrying the most frequent genetic defect in humans, was modified. The mouse model mimics many pathological features of the human pathology, yet retinal degeneration and vision loss appearing in a mild form and at a greater age, bright white light was used as a trigger to accelerate disease progression in young mice. Applying two different conditions of light duration and intensity revealed higher light susceptibility for *Cln3*-deficient mice compared to wild type mice. While already in eight to ten week old *Cln3*-deficient retinas slight effects could be observed, retinal thinning, accumulation of autofluorescent material and microglial reactivity were strengthened after light exposure.

To test if therapeutic reduction of microglial reactivity can rescue the retinal phenotype, minocycline, as an immunomodulatory compound, was administered to light-triggered *Cln3*-deficient mice. In addition to the preservation of retinal thickness, a reduced gliosis and accumulation of storage material could be shown for minocycline treated animals.

In conclusion, our work indicates that microglial reactivity has a pivotal role during retinal degeneration of the modified *Cln3*^{Δex7/8} mouse model and that minocycline is a potential drug to modulate inflammatory processes in the retina of jNCL patients.

Inhalt

Neuronale Ceroid Lipofuscinosen (NCL) sind eine Gruppe von lysosomalen Speicherkrankheiten, die zu den seltenen Erkrankungen zählen und frühzeitig zum Tod führen. Die häufigste Unterform ist die juvenile Variante (jNCL), welche sich im Grundschulalter manifestiert. Bei Patienten tritt zunächst eine Sehverschlechterung ein, welche gefolgt wird von geistiger Retardierung, Krampfanfällen, dem Verlust motorischer Fähigkeiten und letztendlich zu vorzeitigem Tod in den späten zwanziger Jahren führt. Die zugrundeliegenden Defekte sind Mutationen im *Cln3* Gen, welches ein ubiquitär exprimiertes, lysosomales Transmembranprotein mit unbekannter Funktion kodiert. Eine besonders häufig auftretende Mutation in über 80% der Patienten, ist die Deletion von Exon 7 und 8, welche zu einem vorzeitigem Stopcodon führt. Durch den Funktionsverlust akkumulieren Speicherstoffe in den Lysosomen und neuronale Zellen sterben.

Neurodegenerative Erkrankungen der Retina sind oft begleitet durch die Aktivierung von Mikrogliazellen. Als Zellen des angeborenen Immunsystems halten sie die Homöostase innerhalb des zentralen Nervensystems aufrecht. Unter physiologischen Bedingungen weisen sie eine charakteristische Morphologie auf. Mit ihren langen und verzweigten Ausläufern tasten sie ihre Mikroumgebung auf pathologische Veränderungen ab. Eine große Anzahl an sterbenden Zellen führt zu einer chronischen Aktivierung von Mikrogliazellen. Hierbei zeigen sie eine morphologische Änderung, indem die Ausläufer eingezogen werden und eine Migration aus den plexiformen Schichten zum Schadensort stattfindet. Zusätzlich exprimieren Mikroglia unter diesen Bedingungen eine große Menge an zytotoxischen Substanzen welche in Kombination mit der Phagozytose von lebenden Photorezeptoren zu einem größeren Schadensausmaß des umliegenden Gewebes führt.

Um den Einfluss von chronischer Mikrogliaaktivierung in der retinalen Pathogenese bei jNCL genauer zu untersuchen wurde das $Cln3^{\Delta ex7/8}$ Mausmodell genutzt, welches den gleichen Gendefekt wie die meisten jNCL Patienten trägt. Dieses Mausmodell zeigt viele pathologische Eigenschaften, wie sie im Patienten auftreten. Der retinale Phänotyp ist jedoch nur leicht ausgeprägt und tritt erst in einem hohen Alter auf, was im Gegensatz zum humanen Verlauf steht. Um die pathologischen Veränderungen der Netzhaut besser in jungen Mäusen untersuchen zu können, wurde helles Weißlicht als Trigger genutzt. Hierbei konnte ein niedrigerer Schwellenwert für lichtinduzierte Degeneration in *Cln3*-defizienten Mäusen gezeigt werden. Erste Anzeichen von retinaler Degeneration, welche in jungen $Cln3^{\Delta ex7/8}$ Mäusen beobachtet wurden, waren nach der Exposition mit hellem Weißlicht verstärkt zu erkennen. Neben einer starken Reduktion der retinalen Dicke und der Akkumulation von Speicherkomponenten war eine erhöhte Reaktivität von Mikrogliazellen nachzuweisen.

Um zu testen, ob eine Modulation der mikroglialen Immunantwort die retinale Pathogenese abmildern kann, wurden die modifizierten $Cln3^{\Delta ex7/8}$ Mäuse mit Minozyklin, einer immunmodulatorischen Substanz, behandelt. Es zeigte sich, dass die Behandlung mit Minozyklin die retinale Dicke erhalten kann, weniger Speichermaterial abgelagert wird und deutlich weniger Reaktivität von Mikrogliazellen

auftritt.

Zusammengefasst zeigt diese Studie, dass die chronische Reaktivität von Mikrogliazellen eine essentielle Rolle in der retinalen Pathogenese der modifizierten $Cln3^{\Delta ex7/8}$ Mäuse spielt, welche durch Minozyklinbehandlung abgemildert werden kann. Damit ist die Minozyklintherapie ein vielversprechender Ansatz für die Behandlung der chronischen Aktivierung des Immunsystems bei jNCL Patienten.